DOI:10.16016/j.1000-5404.201911065

# 多肽 bCAT 联合卡泊芬净对白色念珠菌菌丝及成熟生物被膜的作用

刘 贤,许 珊,沈一鸣,亢胜男,刘景仑,陈晓迎,张 丹 400016,重庆,重庆医科大学附属第一医院急诊医学科

[摘要] **目的** 探讨嗜铬粒蛋白 A(chromogranin, CGA)衍生多肽 bCAT 联合卡泊芬净(caspofungin, CAS)对白色念珠菌菌丝及成熟生物被膜的作用及机制。**方法** 以标准菌株 ATCC10231 为研究对象,体外建立生物被膜模型,分别用 bCAT、CAS、bCAT 联合 CAS 作用于被膜,以 RPMI1640 干预作为空白对照组(control 组)。XTT 法检测生物被膜代谢活性的变化,并计算抗成熟生物被膜 50%的 MIC($MBIC_{50}$),RT-PCR 检测黏附因子 ALS3 的 mRNA 表达,DCFH-DA 观察细胞内 ROS 含量的变化,SYTO9/PI 染色观察生物被膜通透性的变化。**结果** bCAT 及 CAS 抗成熟生物被膜的 $MBIC_{50}$ 分别为 3 105、128 μg/mL,两者联合使用时抗成熟被膜的 $MBIC_{50}$ 分别降至 776、4 μg/mL,RT-PCR 检测结果显示 bCAT+CAS 组处理被膜后 ALS3 表达量为(1.71±0.65)%,与 control、bCAT(776 μg/mL)、CAS(4 μg/mL)组比较差异具有统计学意义($P<0.05$);ROS 含量为(428.96±47.67)%,与 control、bCAT(776 μg/mL)、CAS(4 μg/mL)组比较差异具有统计学意义($P<0.05$);bCAT+CAS 组中死亡菌明显增加,菌丝相真菌明显减少。**结论** CGA 衍生多肽 bCAT 联合 CAS 具有协同抗成熟被膜作用,其机制可能与降低黏附因子 ALS3 的表达而抑制菌丝的形成、增加 ROS 含量造成氧化损伤相关。

[关键词] 嗜铬粒蛋白 A;白色念珠菌;生物被膜;卡泊芬净;协同

[中图法分类号] R379.4; R977.6; R978.5 [文献标志码] A

# Effect of polypeptide bCAT combined with caspofungin on hypha and mature biofilm in *Candida albicans*

LIU Xian, XU Shan, SHEN Yiming, KANG Shengnan, LIU Jinglun, CHEN Xiaoying, ZHANG Dan Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of chromogranin (CGA)-derived polypeptide bCAT combined with caspofungin (CAS) on hypha and mature biofilm in *Candida albicans* (*C. albicans*). **Methods** Standard strain ATCC 10231 of *C. albicans* was employed as the study objective. The changes of biofilm metabolic activity after bCAT and CAS treatment alone or combined together (RPMI1640 as control group) were detected by XTT assay, and the results were calculated for the minimal biofilm inhibitory concentration ($MBIC_{50}$). The expression of agglutinin-like sequence 3 (ALS3) was detected by RT-PCR, and the production of reactive oxygen content (ROS) was observed by DCFH-DA. SYTO9/PI staining was used to detect the fungal membrane permeability. **Results** The $MBIC_{50}$ after bCAT and CAS treatment was 3 105 and 128 μg/mL, respectively. And the $MBIC_{50}$ of bCAT combined with CAS was decreased to 776 μg/mL and 4 μg/mL, respectively. The expression of ALS3 in the bCAT+CAS group was (1.71±0.65)%, which had statistical differences from that of the control, bCAT (776 μg/mL) and CAS (4 μg/mL) groups ($P<0.05$). The ROS content was (428.96±47.67)%, with significant difference compared with the control, bCAT (776 μg/mL) and CAS (4 μg/mL) groups ($P<0.05$). There were more

[基金项目] 重庆市卫计委重点项目(2016ZDXM001);国家自然科学基金面上项目(81071531,81372102)

[通信作者] 张 丹,E-mail:doctor_zhangdan@126.com

dead *C. albicans* in mature biofilm in the bCAT + CAS group, and the fungal hypha were decreased significantly. **Conclusion** CGA-derived polypeptide bCAT combined with CAS has the synergistic anti-mature biofilm effect, and the mechanism may be associated with decreased expression of ALS3 and inhibition of hypha formation, and oxidative damage caused by increased ROS content.

[**Key words**] chromogranin A; *Candida albicans*; biofilm; caspofungin; synergistic effect

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Committee of Health and Family Planning (2016ZDXM001) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071531, 81372102); Corresponding author: ZHANG Dan, E-mail: doctor_zhangdan@126.com

白色念珠菌是侵袭性真菌感染最常见的病原微生物,位居医院获得性感染的第4位,病死率高达30%~40%[1-2]。生物被膜是白色念珠菌感染患者死亡的一个危险因素[3],由细胞外基质包裹真菌孢子、菌丝及假菌丝组成,对抗真菌药物的耐药性增加是其重要特征,是造成临床真菌感染迁延不愈和失败的主要原因[4-5]。

菌丝能增强白色念珠菌逃避宿主氧化应激的损伤,是白色念珠菌侵袭及被膜成熟的重要条件[6-7]。凝集素样黏附素3(agglutinin-like sequence 3, ALS3)在菌丝形成过程中起关键作用。有研究将白色念珠菌的ALS3基因敲除后,敲除菌株对宿主细胞的黏附能力下降,菌丝形成受到抑制,生物被膜形成受到抑制[8]。

卡泊芬净(caspofungin, CAS)属棘白菌素类抗真菌药物,在体外和体内有明显的抗生物被膜作用[9-10],但CAS治疗对生物被膜的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)是其抗浮游状态真菌细胞的200倍以上[11]。

抗菌多肽(antimicrobial peptides, AMPs)是一系列具有抗菌活性短肽的总称,是机体天然免疫的重要组成部分[12]。嗜铬粒蛋白A(chromogranin, CGA)是肾上腺髓质分泌的重要应激激素原之一,在牛、人等多种种属内高度保守,其水解片段bCAT(bovine CGA344-358)和bCHR(bovine CGA47-66)具有抗菌活性[13]。我们的前期研究发现bCAT能抑制白色念珠菌生物被膜形成[14],但对于成熟生物被膜的作用及与抗真菌药物联合作用未有研究。

开发新的抗真菌药物或联合应用现有药物均是目前解决真菌生物被膜相关耐药问题的有效途径和方法。目前,已有少量研究将CAS与抗菌物质(如植物防御素HsAFP1)联合作用以达到协同抗白色念珠菌生物被膜的作用[15-16]。因此,本研究基于目前真菌生物被膜耐药性这个焦点问题,联合使用抗菌多肽bCAT与CAS,探讨两种药物联用对白色念珠菌成熟生物被膜中细胞形态、黏附素ALS3基因表达及细胞活性氧含量产生的影响,旨在为难治性生物被膜感染提供新的解决思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白色念珠菌标准菌株ATCC10231购自北京中科质检生物技术有限公司(中国);bCAT(氨基酸序列:RSMRLSFRARGYGFRGPGLQL,纯度:95%,分子量:2425.84)由上海科肽生物科技有限公司合成(中国)。3,3′-[1-(苯氨酰基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠(Sodium3,3′-[1-(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid, XTT)、二甲基亚砜、甲萘醌、2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐(2′, 7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)、RPMI1640培养基均购自Sigma公司(美国),荧光染料SYTO9/PI购自Invitrogen公司(美国),YPD(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)液体培养基、沙氏琼脂培养基(Sabouraud's Agar, SDA)购自索莱宝公司(中国),磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline,PBS)购自博士德生物工程有限公司(中国)。注射用醋酸卡泊芬净购自默沙东公司(法国)。引物由上海生工合成(中国)。真菌总RNA提取试剂盒购自OMEGA公司(美国),逆转录和qRT-PCR试剂盒购自上海创英生物科技有限公司(中国)。

### 1.2 菌种和培养条件

冻存于-80 ℃的白色念珠菌标准菌株ATCC10231接种于SDA平板,37.0 ℃培养24~48 h,肉眼观察白色菌落形成;挑选单个白色菌落接种于含有2 mL YPD培养基的试管中,放置于摇床37.0 ℃、100 r/min培养24 h以保证菌株的纯度与活力。离心(1 000 r/min, 10 min)后PBS充分清洗YPD培养基,重复2次后加入RPMI1640培养基,使用血细胞计数板计数调整菌液浓度为$10^6$个/mL后放置于4 ℃备用。

### 1.3 XTT法测bCAT和CAS抗白色念珠菌成熟生物被膜[17]

96孔板中每孔加入100 μL菌液,保鲜膜覆盖创造微氧环境后放入37 ℃孵箱中生长24 h形成生物被膜,倒置显微镜下观察到孢子、菌丝体及假菌丝,PBS充分

洗涤后采用两倍稀释法依次加入 bCAT、CAS,使 bCAT 最终药物浓度为 3 105、1 553、776、388、194 μg/mL,CAS 最终浓度为 128、64、32、16、8 μg/mL,以不加入 bCAT 及 CAS 的 RPMI1640 培养基作为空白对照组(control 组)。药物作用 24 h 后 PBS 充分洗涤未黏附的白色念珠菌,每孔加入 100 μL XTT(0.5 μg/mL)及甲萘醌混合物(1 μmol/L)后避光放置于恒温箱中 37 ℃作用 2 h 后使用多功能酶标仪测定 490 nm 处的光密度值[$D$(490)]。计算各实验组代谢活性(metabolic activity)=[实验组 $D$(490)/ccontrol 组 $D$(490)]×100%,当代谢活性小于 50%时认为抗成熟生物被膜有效,此时的药物浓度记为 $MBIC_{50}$。每次设置 3 个实验孔重复 3 次。

### 1.4 棋盘法测定 bCAT 联合 CAS 对白色念珠菌生物被膜的作用

生物被膜培养方法及代谢活性检测同 1.3,棋盘稀释法加药简述如下:bCAT 及 CAS 从低于 $MBIC_{50}$ 下一个浓度开始用 RPMI1640 倍比稀释,各取 50 μL 分别加入已培养生物被膜平板(方法同 1.3)的行与列上,37 ℃孵箱中作用 24 h 后测生物被膜的代谢活性(方法同 1.3)。以协同抗菌指数(FICI)来判定药物的相互作用方式,公式为:FICI =(联合用药时 A 药 MIC/单独应用 A 药时 MIC)+(联合应用 B 药时 MIC/单独应用 B 药时 MIC)。FICI 指数为≤0.5、>0.5~1、>1~2、>2 时分别表示协同、相加、无关、拮抗作用。每次设置 3 个实验孔并重复 3 次。

### 1.5 激光共聚焦观察生物被膜活死菌变化

使用 SYTO9/PI 荧光染料对被膜细胞进行荧光标记,其中 SYTO9 能将成熟生物被膜中活的真菌细胞标记为绿色荧光,而 PI 能透过死亡的真菌细胞,标记为红色荧光。将处理后的生物被膜使用无菌水冲洗 2 遍,加入 200 μL SYTO9/PI 染料,室温避光孵育 30 min,无菌水洗去残留染料,激光共聚焦显微镜观察被膜活死菌变化,并使用 Image J 软件进行荧光定量分析。

### 1.6 DCFH-DA 测细胞内活性氧(ROS)含量[18-19]

根据 1.3 方法处理成熟生物被膜后将孔板内生物被膜刮出,血细胞计数板调整菌液浓度为 $10^6$ 个/mL,加入 100 μL DCFH-DA 溶液(溶于 DMSO 中,最终浓度 10 μg/mL),使用多功能酶标仪测 37 ℃下 DCFH-DA 作用 0 min(F0)及 30 min(F30)后的荧光量(激发波长 488 nm,发射波长 520 nm)。根据公式计算 ROS 相对含量:ROS 相对含量(%)=[(F30−F0)/F0]×100%。

### 1.7 RT-PCR 检测被膜黏附因子 ALS3 mRNA 的表达

使用真菌 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,核酸测定仪(NanoDrop2000/2000c)检测总 RNA 纯度和浓度,用 2X SYBR Green Master MIX 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA 用于 PCR 扩增,使用 EvanGreen qPCR Master Mix 进行 PCR 定量。PCR 反应体系为:PCR Mix 10 μL,基因上下游引物各 0.25 μL,cDNA 1 μL,超纯水补至终体积为 20 μL。反应参数为:95 ℃预变性 10 min,40 个循环包括 95 ℃变性 15 s,退火 60 ℃ 60 s。用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行检测和分析,mRNA 的表达量以 $2^{(-\Delta Ct\ sample-\Delta Ct\ control)}$ 来计算。引物序列如下:ALS3-正义链:5′-TAATGATGGTGGCAAGAA-3′,ALS3-反义链:5′-TAGCGAATCCCATTGTAC-3′,ACT1-正义链:5′-GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA-3′,ACT1-反义链:5′-GACAATTTCTCTTTCAGCACTAGTAGTGA-3′。

### 1.8 统计学分析

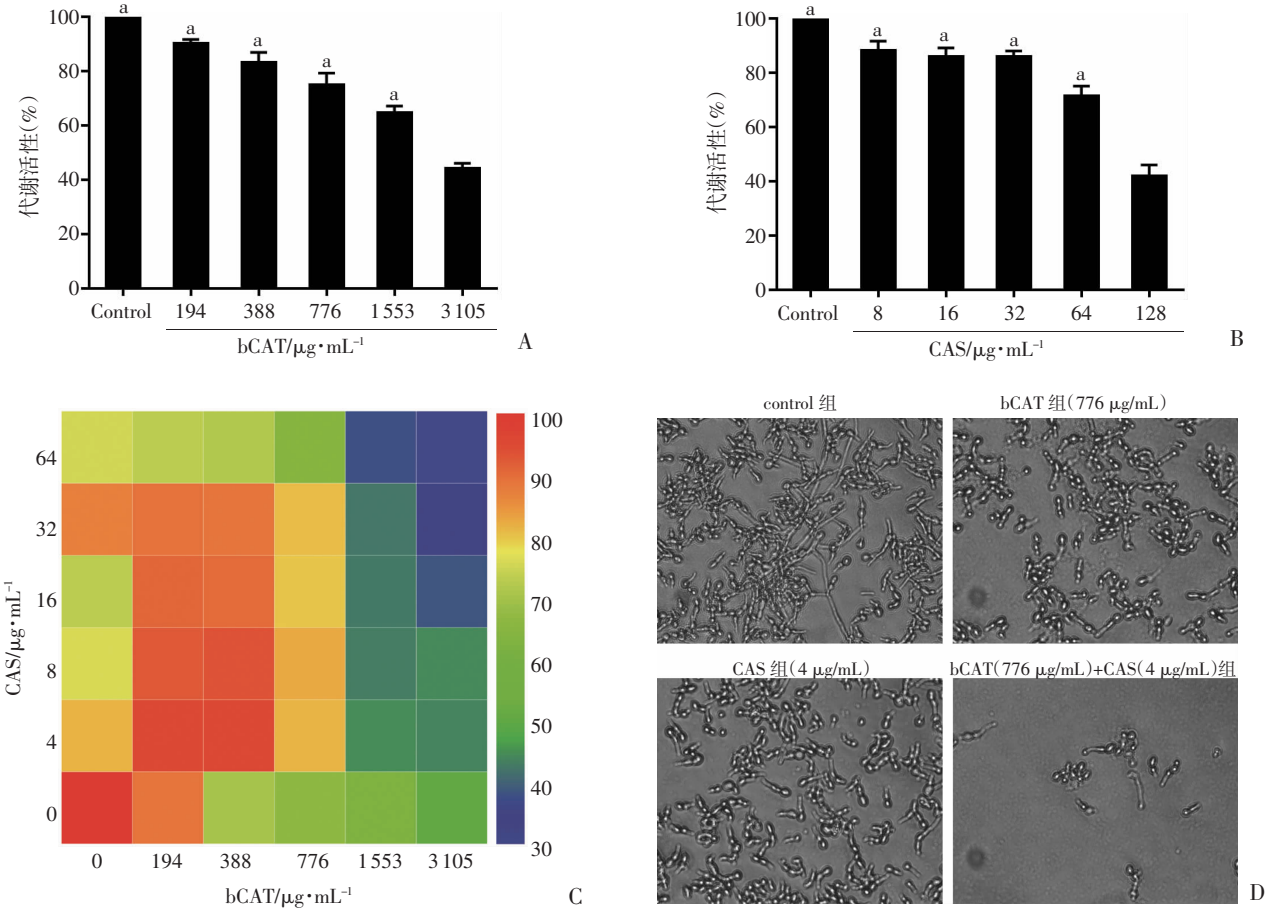
采用 SPSS 22.0 软件分析、GraphPad prism5 作图,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,其两两比较使用 Dunnett T3 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

## 2 结果

### 2.1 bCAT 联合 CAS 具有协同抗菌作用

XTT 检测结果显示,bCAT 及 CAS 抗成熟被膜 $MBIC_{50}$ 分别为 3 105 μg/mL、CAS 128 μg/mL。bCAT 浓度为 3 105 μg/mL 时,生物被膜代谢活性为(44.25±5.26)%,不同 bCAT 浓度比较差异具有统计学意义($F$=55.71,$P$<0.05),两两比较发现各组与 3 105 μg/mL 组相比,差异具有统计学意义($P$<0.05,图 1A)。不同浓度 CAS 作用后生物被膜活性改变如图 1B 所示,当 CAS 浓度为 128 μg/mL 时,被膜代谢活性为(41.99±11.88)%,组间比较差异具有统计学意义($F$=44.43,$P$<0.05),两两比较发现各组与 3 105 μg/mL 组相比,差异具有统计学意义($P$<0.05)。采用棋盘稀释法检测 bCAT 联合 CAS 抗成熟被膜作用,当 bCAT 浓度 776 μg/mL 联合 CAS 浓度 4 μg/mL 时,成熟被膜代谢活性为(46.66±1.62)%(图 1C),FICI 值为(0.281 25,<0.5),两者联合使用具有协同抗菌作用。

倒置显微镜观察白念珠菌酵母-菌丝态的转换,实验结果显示,在加药作用 24 h 后,control 组菌丝形态形成正常(图 1D),视野下见大量菌丝相真菌。bCAT(776 μg/mL)和 CAS(4 μg/mL)单独作用不能有效抑制白念珠菌酵母-菌丝态转换,但与 control 组相比,菌丝形成较短(图 1D)。联合作用时,菌丝相细胞明显减少(图 1D)。




A: bCAT 抗成熟生物被膜 a: $P<0.05$,与 bCAT 浓度为 3 105 μg/mL 比较;B: CAS 抗成熟生物被膜 a: $P<0.05$,与 CAS 浓度为 128 μg/mL 比较;C: 棋盘稀释法检测 bCAT 与 CAS 联合使用抗白色念珠菌成熟生物被膜 热图中红色代表成熟生物被膜 100%代谢活性,蓝色代表 30%代谢活性;D: 倒置显微镜观察白色念珠菌形态(×400)

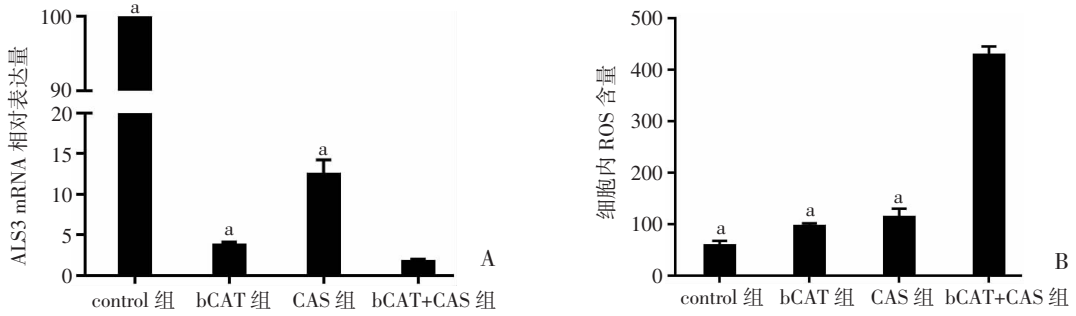
**图 1 bCAT 协同 CAS 抗成熟生物被膜**

### 2.2 PCR 检测黏附因子 mRNA 表达量及荧光酶标仪检测 ROS 含量的变化

RT-PCR 结果显示,单用 bCAT 与 CAS 时 ALS3 基因表达分别为(12.48±5.30)%、(3.74±1.10)%,两者联合作用后 ALS3 表达量为(1.71±0.65)%,经单因素方差分析比较,组间差异具有统计学意义($F=29.733$, $P<0.05$),两两比较采用 T3 检验,发现 control、bCAT、CAS 组与 bCAT+CAS 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2A)。对于 ROS 含量的检测,发现各组被膜 ROS 含量分别为,control 组:(58.69±25.46)%,bCAT 组:(95.89±17.18)%,CAS 组:(114.06±47.64)%,bCAT+CAS 组:(428.96±47.67)%,bCAT 联合 CAS 明显增加了 ROS 含量,组间差异具有统计学意义($F=192.503$, $P<0.05$),与 bCAT+CAS 组比较,control、bCAT、CAS 组差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2B)。

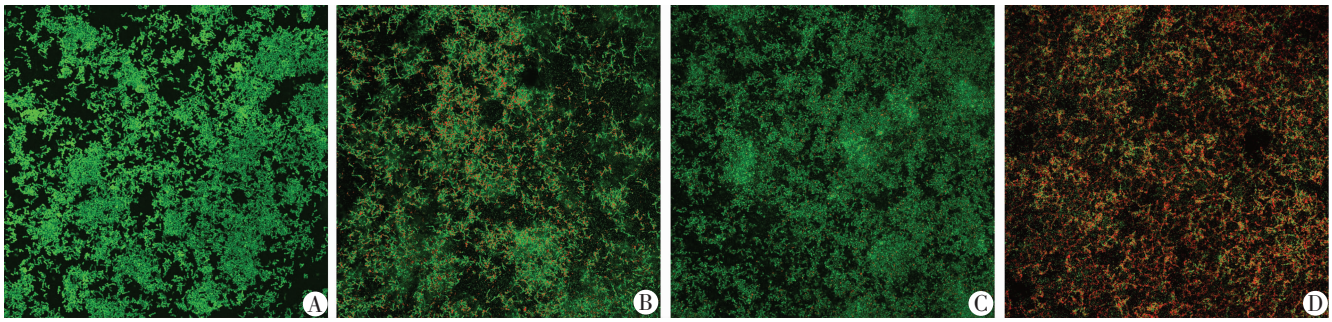
### 2.3 激光共聚焦显微镜观察生物被膜活死菌变化

激光共聚焦显微镜观察 SYTO9/PI 染色后白色念珠菌的活性变化,绿色代表活菌,红色代表死菌。结果显示 control 组、bCAT、CAS 组以绿色荧光为主,其中 bCAT 组及 CAS 组见少量红色荧光,表明活菌数较多(图 3A~C)。而在 bCAT+CAS 组中见大量红色荧光,绿色荧光较少,表明死菌数增加(图 3D),各组具体荧光强度变化见表 1。




control 组为空白对照组,bCAT 处理被膜的浓度为 776 μg/mL,CAS 浓度为 4 μg/mL;a: $P<0.05$,与 bCAT+CAS 组比较;A: 黏附因子 ALS3 基因相对表达量;B: 生物被膜细胞内 ROS 含量的变化

**图 2 生物被膜黏附因子 ALS3 基因表达量及被膜内细胞 ROS 含量的变化**




生长成熟的白色念珠菌生物被膜在 bCAT、CAS 作用 24 h 后 SYTO9/PI 染色,使用激光共聚焦观察白色念珠菌细胞的活性变化,其中绿色荧光表示活菌,红色荧光表示死菌 A:control 组;B:bCAT(776 μg/mL)组; C:CAS(4 μg/mL);D:bCAT(776 μg/mL)+CAS(4 μg/mL)组

**图 3 激光共聚焦观察生物被膜活死菌变化** (×100)

**表 1 Image J 定量白色念珠菌生物被膜荧光强度变化**

| 组别 | 荧光 | 区域 | 平均荧光强度 |
|---|---|---|---|
| control 组 | 绿色荧光 | 1048576 | 21 465.63 |
| | 红色荧光 | 1048576 | 36.10 |
| bCAT 组 | 绿色荧光 | 1048576 | 14 798.24 |
| | 红色荧光 | 1048576 | 3 915.11 |
| CAS 组 | 绿色荧光 | 1048576 | 15 054.17 |
| | 红色荧光 | 1048576 | 1 183.08 |
| bCAT+CAS 组 | 绿色荧光 | 1048576 | 3 264.00 |
| | 红色荧光 | 1048576 | 11 530.37 |

## 3 讨论

生物被膜的形成是白色念珠菌的主要耐药机制,白色念珠菌形成生物被膜的能力与患者感染死亡率密切相关[20]。目前临床使用抗真菌药物如氟康唑对成熟生物被膜基本无作用,两性霉素 B 脂质体和 CAS 虽然被证实能治疗被膜感染,但其 $MBIC_{50}$ 明显升高,大大增加毒副作用[21]。因此,针对成熟生物被膜治疗的研究已经迫在眉睫。

抗真菌药物联合用药是指将抗真菌药物与非抗真菌药联合使用,或者两种及以上抑制真菌生长代谢不同阶段或不同靶点的抗真菌药物联合应用,从而产生协同抗真菌作用,降低了使用高剂量药物的副作用[22]。CAS 属棘白菌素类抗菌素,能通过抑制真菌细胞壁的 β-(1,3)-D-葡聚糖合成[23],破坏成熟被膜的细胞壁。bCAT(bCGA344-364)是 CGA 衍生的具有抗菌活性的多肽片段,bCGA344-358 是其活性中心,为阳离子多肽(+5)并富含脯氨酸,能穿透细胞膜,到达细胞内,发挥抗菌作用[24-25]。本研究通过二倍稀释法研究发现 bCAT 及 CAS 单独作用于成熟的生物被膜的 $MBIC_{50}$ 分别为 3 105、128 μg/mL,对比抗浮游状态念珠菌的浓度明显增加。并通过棋盘稀释法联合使用 bCAT 及 CAS 联合作用于成熟被膜的 $MBIC_{50}$ 为 776 μg/mL+4 μg/mL。明显降低了 bCAT 及 CAS 的用量,并且具有协同作用(FICI<0.5)。

黏附是被膜形成的第一步,酵母相-菌丝相的转变是生物被膜形成的重要环节,黏附因子的高表达在此过程中产生重要作用[26-27]。ALS3 是黏附蛋白家族中重要的黏附素,在成熟生物被膜中高表达[28]。MANOHAR-N

等[29]的研究证实,降低 ALS3 基因的表达能抑制菌丝形成,从而抑制被膜的形成。我们的研究发现 bCAT 及 CAS 能有效降低 ALS3 基因的表达,联合使用更显著,从而抑制白色念珠菌孢子向菌丝的转变,发挥抗成熟被膜的作用。

此外,通过不触发 ROS 的产生来逃避中性粒细胞的杀伤作用,也是白色念珠菌通过被膜产生耐药的重要机制之一[30]。ROS 是细胞代谢的副产物,当胞内 ROS 水平超过其自身代谢水平,过多的 ROS 会破坏细胞大分子,如蛋白质、DNA 等,造成细胞损伤,最终导致细胞死亡[31]。已有研究证实增加 ROS 具有抗白色念珠菌生物被膜的作用[32-33]。本研究结果证实 bCAT 联合 CAS 能增加成熟生物被膜 ROS 含量。同时,通过激光共聚焦发现 bCAT 与 CAS 联合作用于成熟被膜后,生物被膜中死菌(红色荧光)明显增加,表明与 CAS 的联合使用增加了 bCAT 穿透细胞的能力,引起细胞内环境的变化,增加 ROS 含量,造成细胞损伤明显。

生物被膜是真菌为适应环境变化做出的改变,一旦形成后,针对浮游状态的药物常规 MIC 值便不能达到有效抗菌的效果。本研究发现 bCGA 衍生多肽 bCAT 联合 CAS 具有协同抗成熟生物被膜的作用,抑制及破坏已形成的菌丝,可能机制与降低 ALS3 表达、增加细胞膜通透性及细胞内 ROS 含量有关。本研究具有一定的临床前景,有望为临床真菌难治性生物被膜感染的治疗思路提供依据。本研究也存在一定局限性,如仅从标准菌株进行研究,未对临床菌株进行相关研究。

**参考文献:**


[1] MCCARTY T P, PAPPAS P G. Invasive candidiasis[J]. Infect Dis Clin North Am, 2016, 30(1): 103-124. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.013.

[2] GIRI S, KINDO A J. A review of *Candida* species causing blood stream infection[J]. Indian J Med Microbiol, 2012, 30(3): 270-278. DOI:10.4103/0255-0857.99484.

[3] RAJENDRAN R, SHERRY L, NILE C J, *et al*. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(1): 87-93. DOI:10.1016/j.cmi.2015.09.018.

[4] TAFF H T, MITCHELL K F, EDWARD J A, *et al*. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance[J]. Future Microbiol, 2013, 8(10): 1325-1337. DOI:10.2217/fmb.13.101.

[5] GOMINET M, COMPAIN F, BELOIN C, *et al*. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017?[J]. APMIS, 2017, 125:365. DOI:10.1111/apm.12665

[6] LIU Y P, FILLER S G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(2): 168-173. DOI:10.1128/EC.00279-10.

[7] 胡婵, 曹智, 吴煜昊, 等. 白念珠菌氧化应激机制的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2019, 14(3): 189-192.
HU C, CAO Z, WU Y H, *et al*. Research progress on oxidative stress mechanism of *Candida albicans*[J]. Chin J Mycol, 2019, 14(3): 189-192.

[8] PHAN Q T, MYERS C L, FU Y, *et al*. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells[J]. PLoS Biol, 2007, 5(3): e64. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050064.

[9] COCUAUD C, RODIER M H, DANIAULT G, *et al*. Antimetabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(3): 507-512. DOI:10.1093/jac/dki269.

[10] SHUFORD J A, ROUSE M S, PIPER K E, *et al*. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model[J]. J Infect Dis, 2006, 194(5): 710-713. DOI:10.1086/506452.

[11] TURAN, DEMIRBILEK M. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents[J]. Rev Argent Microbiol, 2018, 50(1): 62-69. DOI:10.1016/j.ram.2017.05.003.

[12] HUANG H W, CHARRON N E. Understanding membrane-active antimicrobial peptides[J]. Q Rev Biophys, 2017, 50: e10. DOI:10.1017/S0033583517000087.

[13] ZHANG D, SHOOSHTARIZADEH P, LAVENTIE B J, *et al*. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2[J]. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4501. DOI:10.1371/journal.pone.0004501.

[14] 许珊, 张舒, 张丹, 等. 多肽 bCAT 通过下调白念珠菌 HWP1 基因表达抑制生物被膜的形成机制[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(4): 387-392. DOI:10.16718/j.1009-7708.2017.04.008.
XU S, ZHANG S, ZHANG D, *et al*. Effect of catestatin on inhibiting *C. albicans* biofilm formation by down-regulating the expression of HWP1[J]. Chin J Infect Chemother, 2017, 17(4): 387-392. DOI: 10.16718/j.1009-7708.2017.04.008.

[15] VRIENS K, COOLS T L, HARVEY P J, *et al*. Synergistic activity of the plant defensin HsAFP1 and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures[J]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0132701. DOI: 10.1371/journal.pone.0132701.

[16] PESEE S, ANGKANANUWAT C, TANCHAROENSUKJIT S, *et al*. *In vitro* activity of Caspofungin combined with Flucon-

azole on mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilm[J]. Med Mycol, 2016, 54(4): 384-393. DOI:10.1093/mmy/myv108.

[17] RAMAGE G, VANDE WALLE K, WICKES B L, *et al*. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(9): 2475-2479. DOI:10.1128/aac.45.9.2475-2479.2001.

[18] WANG H, JOSEPH J A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27(5/6): 612-616. DOI:10.1016/s0891-5849(99)00107-0.

[19] YU Q L, ZHANG B, LI J R, *et al*. Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 99: 572-583. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.014.

[20] SHERRY L, RAJENDRAN R, LAPPIN D F, *et al*. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity[J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 182. DOI:10.1186/1471-2180-14-182.

[21] DENNING D W, BROMLEY M J. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline[J]. Science, 2015, 347(6229): 1414-1416. DOI:10.1126/science.aaa6097.

[22] SCORZONI L, DE PAULA E SILVA A C, MARCOS C M, *et al*. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 36. DOI:10.3389/fmicb.2017.00036.

[23] SONG J C, STEVENS D A. Caspofungin: Pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical uses and treatment outcomes[J]. Crit Rev Microbiol, 2016, 42(5): 813-846. DOI:10.3109/1040841X.2015.1068271.

[24] MAHATA S K, MAHATA M, LIVSEY TAYLOR C V, *et al*. The novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A344-364). Properties and function[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 482: 263-277. DOI:10.1007/0-306-46837-9_21.

[25] BRIOLAT J, WU S D, MAHATA S K, *et al*. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(3): 377-385. DOI:10.1007/s00018-004-4461-9.

[26] VEDIYAPPAN G, DUMONTET V, PELISSIER F, *et al*. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*[J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e74189. DOI:10.1371/journal.pone.0074189.

[27] HAQUE F, ALFATAH M, GANESAN K, *et al*. Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23575. DOI:10.1038/srep23575.

[28] ROUDBARMOHAMMADI S, ROUDBARY M, BAKHSHI B, *et al*. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis[J]. Adv Biomed Res, 2016, 5: 105. DOI:10.4103/2277-9175.183666.

[29] MANOHAR-N R K, LEE J H, KIM Y G, *et al*. Alizarin-nd chrysazin inhibit biofilm and hyphal formation by *Candida albicans*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 447. DOI:10.3389/fcimb.2017.00447.

[30] PHILLIPS A J, SUDBERY I, RAMSDALE M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(24): 14327-14332. DOI:10.1073/pnas.2332326100.

[31] HALLIWELL B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? [J]. Biochem J, 2007, 401(1): 1-11. DOI:10.1042/bj20061131.

[32] DELATTIN N, CAMMUE B P, THEVISSEN K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms[J]. Future Med Chem, 2014, 6(1): 77-90. DOI:10.4155/fmc.13.189.

[33] DE CREMER K, DE BRUCKER K, STAES I, *et al*. Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27463. DOI:10.1038/srep27463.

(收稿:2019-11-08;修回:2020-01-03)

(编辑 邓强庭)